

**NEW ACID ANHYDRIDE AND CHYMOTRYPSIN-LIKE PROTEASE INHIBITOR**

**Patent number:** JP11049739  
**Publication date:** 1999-02-23  
**Inventor:** ITO KIMIO; IGARASHI KATSUHIDE  
**Applicant:** NIPPON STEEL CORP  
**Classification:**  
- **International:** C07C255/57; A61K31/275; C12N9/99  
- **European:**  
**Application number:** JP19970210620 19970805  
**Priority number(s):** JP19970210620 19970805

[Report a data error here](#)**Abstract of JP11049739**

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To obtain a new compound useful for a medicine effective in treatment of various diseases such as hypertension and cardiac disease caused by chymotrypsin-like protease, and a biochemical reagent. **SOLUTION:** This new compound is 2,2-dimethyl-3-(N-4-cyanobenzoyl)amino-5-phenylpentanoic anhydride of the formula. The compound of the formula is obtained by reacting 2,2-dimethyl-3-amino-5-phenylpentanoic acid with 4-cyanobenzoyl chloride in the presence of pyridine in dimethylformamide to provide (A) 2,2-dimethyl-3-(N-4-cyanobenzoyl)amino-5-phenyl-pentanoic acid, and further reacting the components A with each other in the presence of triethylamine in methylene chloride by using bromo-tris-pyrrolidino-phosphonium hexafluorophosphate. When using the compound as a medicine, the clinical daily dose by an oral administration is preferably 10-100 mg/adult expressed in terms of an active ingredient.

---

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

(19)日本特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平11-49739

(43)公開日 平成11年(1999)2月23日

(51)Int.Cl.  
C 07 C 255/57  
A 61 K 31/275  
C 12 N 9/99

識別記号  
A E D

F I  
C 07 C 255/57  
A 61 K 31/275  
C 12 N 9/99

審査請求 未請求 請求項の数8 OL (全5頁)

(21)出願番号 特願平9-210620

(22)出願日 平成9年(1997)8月5日

(71)出願人 000006655  
新日本製鐵株式会社  
東京都千代田区大手町2丁目6番3号  
(72)発明者 伊藤 公夫  
神奈川県川崎市中原区井田3丁目35番1号  
新日本製鐵株式会社技術開発本部内  
(72)発明者 五十嵐 勝秀  
神奈川県川崎市中原区井田3丁目35番1号  
新日本製鐵株式会社技術開発本部内  
(74)代理人 弁理士 平木 祐輔 (外1名)

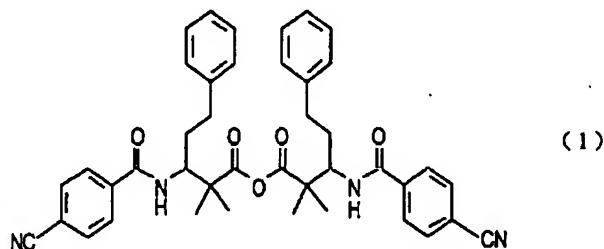
(54)【発明の名称】 新規な酸無水物及びキモトリプシン様プロテアーゼ阻害剤

(57)【要約】

【課題】 キモトリプシン様プロテアーゼ阻害剤として  
新規な酸無水物を提供する。

【解決手段】 構造式(1)

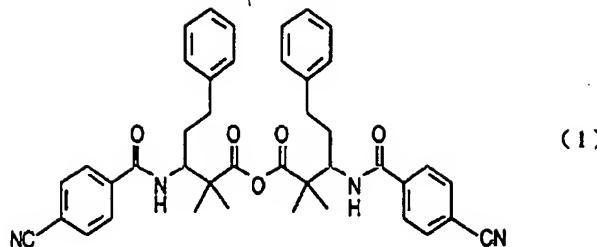
【化1】



で表わされる酸無水物。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】 次の構造式(1)



で表わされる酸無水物。

【請求項2】 請求項1記載の酸無水物またはその塩を、有効成分として含有する医薬。

【請求項3】 医薬が、キモトリプシン様プロテアーゼ阻害剤である請求項2記載の医薬。

【請求項4】 キモトリプシン様プロテアーゼが、キモトリプシン、キマーゼまたはカテプシンGである請求項3記載の医薬。

【請求項5】 請求項2、3または4のいずれか一項に記載の医薬及び薬学的に許容される担体を含有する医薬組成物。

【請求項6】 請求項1記載の酸無水物またはその塩を、有効成分として含有する試薬。

【請求項7】 試薬が、キモトリプシン様プロテアーゼ阻害剤である請求項6記載の試薬。

【請求項8】 キモトリプシン様プロテアーゼが、キモトリプシン、キマーゼまたはカテプシンGである請求項7記載の試薬。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、キモトリプシン様プロテアーゼ阻害剤としての2,2-ジメチル-3-(N-4-シアノベンゾイル)アミノ-5-フェニル-ペニンタン酸無水物に関する。

## 【0002】

【従来の技術】キモトリプシン様プロテアーゼは生理的に多様な役割を担っている。キモトリプシン様プロテアーゼの種類として、例えば、キモトリプシン、キマーゼ、カテプシンG等がある。キモトリプシンは消化酵素であり、また、炎症反応においても機能する。さらに、生化学試薬としても、例えば、ペプチドのマッピングなどに広く用いられている。キマーゼは、ヒトではアンジオテンシン変換酵素以外の新たなAngII(アンジオテン

## 【化1】

(1)

シンII) 产生酵素として、近年、注目されており (J. Biol. Chem. 265巻22348-22357頁1990年)、キマーゼ阻害剤ができれば、高血圧や心疾患といったAngIIに起因する疾病的治療に有効と期待される。また、キマーゼはAngII以外にもコラゲナーゼの活性化にも関与している (J. Biol. Chem. 269巻18134-18140頁1994年)。

【0003】カテプシンGは好中球の顆粒中に発現され、炎症反応に関与していると考えられている。以上の様に、キモトリプシン様プロテアーゼの阻害剤は生化学的な試薬としての利用や、疾病的治療へ広く利用できる可能性を有する。一般に広く知られているキモトリプシン様プロテアーゼの阻害剤としては、キモスタチン、蛋白性キモトリプシンインヒビター、フェニルメチルスルホニルフルオリド (PMSF)、N-トシリル-L-フェニルアラニンクロロメチルケトン (TPCK) などがある。しかしながら、阻害活性の弱さや不安定性の点から、試薬として、あるいは医薬として用いるために、より強力な阻害剤の開発が求められる。

## 【0004】

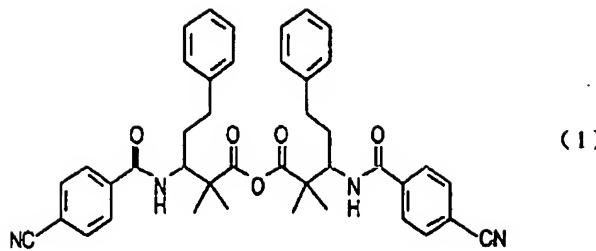
【発明が解決しようとする課題】本発明では、キモトリプシン様プロテアーゼを強力に阻害する化合物を合成し、キモトリプシン様プロテアーゼに起因する様々な疾病的治療のための医薬や、生化学試薬としての利用のために提供する。

## 【0005】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、キモトリプシン様プロテアーゼとしてキモトリプシン、キマーゼ、カテプシンGの酵素活性を指標に合成展開を行なうことにより、本発明の式(1)で示される化合物が強力かつ選択性的にキモトリプシン様プロテアーゼの阻害作用を持つことを見い出した。本発明は次の構造式(1)、

## 【0006】

## 【化2】



で表わされる2,2-ジメチル-3-(N-4-シアノベンゾイル)アミノ-5-フェニル-ペンタン酸無水物に係わるものである。本発明はまた、構造式(1)で表される酸無水物またはその塩を有効成分として含有する医薬に係わるものである。さらに本発明は、構造式(1)で表される酸無水物またはその塩を有効成分として含有する試薬に係わるものである。これら医薬あるいは試薬としては、キモトリプシン様プロテアーゼ阻害剤、例えば、キモトリプシン阻害剤、キマーゼ阻害剤、カテプシンG阻害剤等が挙げられる。

#### 【0007】

【発明の実施の形態】本発明の2,2-ジメチル-3-(N-4-シアノベンゾイル)アミノ-5-フェニル-ペンタン酸無水物は化学合成によって製造することができる。以下、本発明の構造式(1)の化合物に関する製造法を説明する。反応ルートとしては、2,2-ジメチル-3-アミノ-5-フェニルペンタン酸と4-シアノベンゾイルクロライドをビリジンの存在下にジメチルホルムアミド中で反応させることによって、2,2-ジメチル-3-(N-4-シアノベンゾイル)アミノ-5-フェニル-ペンタン酸を得、次いで、トリエチルアミンの存在下に、塩化メチレン中でプロモ-トリス-ピロリジノ-ホスフォニウム-ヘキサフルオロオクタエーテルを用いて2,2-ジメチル-3-(N-4-シアノベンゾイル)アミノ-5-フェニル-ペンタン酸同士を反応させることにより、構造式(1)の2,2-ジメチル-3-(N-4-シアノベンゾイル)アミノ-5-フェニル-ペンタン酸無水物が得られる。

【0008】各段階での反応条件は、溶媒として、クロロホルム、ジクロロメタン、N、N-ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、ビリジン、ジオキサン、テトラヒドロフラン、ジエチルエーテル、酢酸エチル、ヘキサン、アセトニトリル、メタノール、ベンゼン、エタノール、酢酸、アセトンが望ましい。反応温度は、選択される溶媒及びその他の条件により、適宜選択することができる。なお、それぞれの反応段階で、直接反応に関与しない官能基(たとえば、ヒドロキシ、アミノなど)は、通常公知の手段によって保護することができる。直接、反応に関与しない官能基の保護手段に用いる保護基としては、有機化学において通常用いられる保護基、たとえば「プロテクト グループス イン オーガニックシンセシス (Protective groupes in organic synthesis)」(Green著、John Wiley & Sons, Inc. (1981)

年)等に記載されている保護基によって保護することができる。

【0009】また、製造された本発明化合物に対しては、一連の反応終了後に、通常、公知の分離、精製手段を用いることができる。例えば、抽出、分配、再沈殿、再結晶、カラムクロマトグラフィー、蒸留、昇華などによって、より純粋な形で本発明の化合物を取得することができる。上記のようにして得られた2,2-ジメチル-3-(N-4-シアノベンゾイル)アミノ-5-フェニル-ペンタン酸無水物は、試薬としての用途としては、例えば、蛋白質の一次構造解析の際に行なわれる、キモトリプシン様プロテアーゼによる蛋白質分解反応を停止させるための試薬として用いることができる。

【0010】また、上記のようにして得られた2,2-ジメチル-3-(N-4-シアノベンゾイル)アミノ-5-フェニル-ペンタン酸無水物を医薬として用いる場合には、その有効成分として、2,2-ジメチル-3-(N-4-シアノベンゾイル)アミノ-5-フェニル-ペンタン酸無水物またはその製薬上、許容しうる塩を固体若しくは液体の医薬用担体または希釈剤と共に、すなわち賦形剤や安定剤等と共に含む製剤とするのが好ましい。当該製剤において、前記有効成分の担体成分に対する割合は、1~90重量%の間で変動させることができる。当該製剤の剤形及び投与形態としては、顆粒剤、細粒剤、散剤、錠剤、カプセル剤、丸剤若しくは液剤等の剤形にして用いることができる。またさらに、原末のまま経口投与することも可能であり、さらに、注射剤として、静脈内投与、筋肉内投与、または皮下投与ともできる。なお、注射剤として用いる場合には、本発明の化合物を注射用の粉末として、用事調製することもできる。

【0011】経口、経腸若しくは非経口投与に適した有機または無機の、さらに固体または液体の医薬用に用いられる担体か希釈剤を、医薬用のキモトリプシン様プロテアーゼ阻害剤を調製するために用いることができる。水、ゼラチン、乳糖、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、タルク、動植物油脂、ベンジルアルコール、ガム、ポリアルキレングリコール、石油樹脂、やし油、ラノリンその他医薬に用いられる他の担体は全て、医薬用のキモトリプシン様プロテアーゼ阻害剤の担体若しくは希釈剤として用いることができる。また、安定剤や温潤剤や乳化剤を加えたり、浸透圧調製剤またはpH調製剤として塩を補助薬として、適宜用いることができる。さら

に、医薬用のキモトリップシン様プロテアーゼ阻害剤は、種々の疾患の治療において、前記有効成分の他に、必要に応じて他の医薬として有効な成分、例えば他の種類のキモトリップシン様プロテアーゼの阻害成分を含有させることもできる。顆粒剤、細粒剤、散剤、錠剤、またはカプセル剤の形態をとる場合には、前記有効成分を5~80重量%含有させるのが好ましい。液剤の場合には、前記有効成分を1~30重量%の割合で含有させるのが好ましい。さらに、非経口投与剤のうち、注射剤として用いる場合には、前記有効成分を1~10重量%の割合で含有させるのが好ましい。

【0012】臨床投与量は、経口投与の場合、成人に対し上記有効成分として、一日当たり10~100mgを内服するのが好ましい。しかしながら、患者の年齢、症状等によって適宜投与量を増減させることもできる。前記のキモトリップシン様プロテアーゼ阻害剤は、1日1回投与も

可能であるが、適当な間隔を2~3回に分けて投与することもできる。さらに、注射剤として用いる場合には、上記有効成分として、成人に対し1回あたり量1~数10mg投与するのが好ましい。また、その投与注射による段階投与、あるいは、点滴等による持続投与で行なうことが可能である。なお、体外循環用に本発明の化合物を用いる場合には、上記の注射剤の形態で用いることができる。投与量も上記の注射剤の投与量に準ずる。

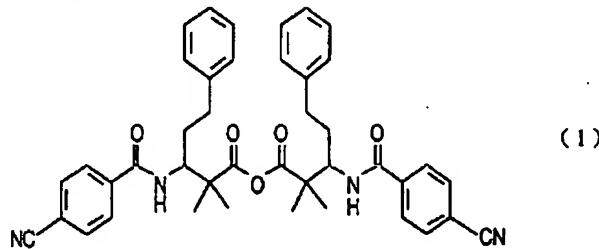
#### 【0013】

【実施例】以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明の範囲はこれらに限定されるものではない。

(実施例1) 2,2-ジメチル-3-(N-4-シアノベンゾイル)アミノ-5-フェニルペントン酸無水物の合成

#### 【0014】

#### 【化3】



2,2-ジメチル-3-アミノ-5-フェニルペントン酸(5g、2.6mmol)をジメチルホルムアミド100mlに溶解し、氷冷下にビリジン(4ml、49.7mmol、2.2eq)を加えた。これに4-シアノベンゾイルクロライド(3.7g、22.6mmol)を徐々に添加し、氷冷下で1時間、その後室温にて4時間攪拌した。溶媒を留去後に、残渣に5%アンモニア水を加え溶解させ、ジエチルエーテルで3回洗浄し、ついでこの水層を氷冷下にクエン酸でpH3とした。これを酢酸エチルで3回抽出し、有機層を飽和食塩水で3回洗浄後に、硫酸ナトリウムで乾燥、溶媒を留去することで、油状の物質を得た。これをn-ヘキサンから結晶化せしめ、2,2-ジメチル-3-(N-4-シアノベンゾイル)アミノ-5-フェニルペントン酸(6.7g、85%)の白色結晶粉末を得た。次に、この2,2-ジメチル-3-(N-4-シアノベンゾイル)アミノ-5-フェニルペントン酸(5g、14.2mmol)を塩化メチレン100mlに溶解し、氷冷下でトリエチルアミン(10ml、71mmol、5eq)を添加し、次いでプロモ-トリス-ピロリジノ-ホスフォニウム-ヘキサフルオロフェート(3.3g、7.1mmol、0.5eq)を添加し、室温にて一晩攪拌した。溶媒を留去後に、残渣をシリカゲルカラム(n-ヘキサン:酢酸エチル=6:1)に添加し、目的の画分を集め、溶媒を留去後に、n-ヘキサンより結晶化し、2,2-ジメチル-3-(N-4-シアノベンゾイル)アミノ-5-フェニルペントン酸無水物2.1g(43%)の白色結晶粉末を得た。

NMR: <sup>1</sup>H (270MHz: CDCl<sub>3</sub>) δ 8.18(4H,d), δ 7.75

(4H,d), δ 7.27(10H,m), δ 3.55(2H,dd), δ 3.07(2H,m), δ 2.79(2H,m), δ 1.98(2H,m), δ 1.78(2H,m), δ 1.32(6H,s), δ 1.18(6H,s)

MS: [M+H]<sup>+</sup> 計算値 682.817 実測値 682.8

【0015】(試験例1) 本発明化合物のキモトリップシン様プロテアーゼ(キモトリップシン、キマーゼ、カテプシンG)に対する阻害活性

本発明化合物(1)のキモトリップシン、キマーゼ、カテプシンGに対する阻害活性は以下のように測定し、阻害活性を評価した。

【0016】キモトリップシンについては0.23pmolのウシキモトリップシンを0.75mMの合成基質スクシニルアラニル-アラニル-プロリル-フェニルアラニン-p-ニトロアニリドを基質として、0.01nMから1mMの本発明の化合物

(1)の存在下、50μl反応液中、37°Cで反応させた。p-ニトロアニリンの生成量を405nmでの吸光度の増加により分光学的に検出した。反応液組成は、250mM Tris-HCl、1M KCl、0.01% TritonX-100(pH8)であった。なお、本発明の化合物(1)はあらかじめ最終濃度の10倍濃度にジメチルスルホキシド(DMSO)で溶解したものを反応系に1/10容量加えることによって、最終的に10%DMSOにて反応をおこなわせた。キモトリップシンの活性は10%DMSOにおいて抑制されなかった。

【0017】さらに、キマーゼについては0.4単位(1単位は1秒間に1pmolのアンジオテンシンIIをアンジオテンシンIから生成するキマーゼの酵素活性)のヒトキ

マーゼを、カテプシンGについては0.71pmolのヒトカテプシンGをそれぞれキモトリプシンと同じ条件において本発明の化合物(1)の阻害活性を評価した。なお、ポジティブコントロールとして、本発明化合物(1)を含まず、10%DMSOのみを含む反応系でも、同様の実験を対照実験として行ない、この各酵素の活性に対する本発明化合物(1)を含む反応系での酵素活性との比較を行ない、酵素活性が50%まで減少するときの本発明化合物(1)の濃度をみつめり、IC50値(単位M)とした。

【0018】本発明化合物(1)のキモトリプシン、キマーゼ、カテプシンGに対する阻害活性をIC50値(単位M)

プロテアーゼ	実施例1の阻害効果 (IC50)	
	IC50	(M)
ウシ キモトリプシン	1.0 (±0.2)	× 10 <sup>-9</sup>
ヒト キマーゼ	7.0 (±1.0)	× 10 <sup>-8</sup>
ヒト カテプシンG	1.8 (±0.2)	× 10 <sup>-7</sup>
ウサギ アンジオテンシン変換酵素	> 1.0	× 10 <sup>-4</sup>

#### 【0020】(試験例2) 毒性試験

本発明の化合物(1)の毒性を下記の方法によって試験した。6週令雄性SDラットに対して、被験物質を0.5%CMC-Na溶液に懸濁して、用量10mg/kgを1日1回、2週間にわたって継続し経口投与した。投与開始前、及び投与中の各日、体重の測定を行なった。所定量の血液を投与期間終了の翌日採血し、血液検査を行ない、また採取した尿の検査を実施した。加えて、剖検により臓器の変異の有無を検査した。実施例1の化合物を投与した例では、投与期間中、死亡は見られず、体重推移、血液検査、尿検査、剖検などにおいて明らかな異常はみられなかつた。この試験結果より、本発明の化合物(1)は低毒性であると示唆された。

【0021】(製剤例) 下記の処方に従い、実施例1の化合物を有効成分とする錠剤を製造した。

実施例1の化合物 10mg

M)で表1に示した。いずれもIC50値は0.2μM未満であり、キモトリプシン様プロテアーゼを一様に強く阻害した。一方、キモトリプシン様プロテアーゼ以外のプロテアーゼとして金属プロテアーゼに属するアンジオテンシン変換酵素に対する本発明の化合物(1)の阻害活性は、IC50値が100μM以上であった。したがつて、本発明の化合物(1)はキモトリプシン様プロテアーゼを選択的に、かつ、非常に強力に、阻害する活性を有する。

【0019】

【表1】

ステアリン酸マグネシウム	30mg
ヒドロキシプロビルメチルセルロース	2mg
ポリエチレングリコール	0.5mg
乳糖	残部
(1錠当たりの総重量	200mg)

【0022】

【発明の効果】本発明により、新規なキモトリプシン様プロテアーゼ阻害剤；無水2,2-ジメチル-3-(4-シアノベンゾイルアミノ)-5-フェニルペニタン酸及びそれを有効成分とする薬剤は、キモトリプシン様プロテアーゼに対して選択的かつ強力な阻害作用を示し、キモトリプシン、キマーゼ、カテプシンGなどのキモトリプシン様プロテアーゼの活性亢進に起因する各種疾患の予防と治療に用いられる医薬としてきわめて有効である。また、強力な阻害作用を利用して、キモトリプシン様プロテアーゼ阻害剤としての生化学的な試薬として有効である。